

# 分子伴侣在蛋白质折叠中的作用

郑 东 东

(北京师范大学分析测试中心 100875)

著名的 Anfinsen 经典实验——牛胰核糖核酸酶体外复性实验确立了蛋白质自装配原则，即蛋白质一级结构决定高级结构。在包括该实验在内的一些蛋白质体外重折叠反应中，变性蛋白质重折叠过程是自发的，无需其他蛋白质参与；而且也不需要能量。因此这类重折叠反应不能准确反映蛋白质在细胞内的折叠过程。首先，蛋白质体外重折叠反应的正确折叠率较低，一般仅高于 5%<sup>[1]</sup>。然而在体内却有 95% 以上的新生肽链折叠至天然构象<sup>[2]</sup>。第二，体外重折叠成功的可能性随变性蛋白质浓度及反应体系温度下降而增加<sup>[3]</sup>。但在细胞生理条件下，新生肽链浓度和温度均较高。第三，体外重折叠是完整多肽链折叠，而体内折叠则可在蛋白质翻译完成前就开始进行<sup>[2]</sup>。上述差别不仅说明蛋白质体外重折叠和体内折叠过程的明显不同，而且还显示出蛋白质体内折叠过程的复杂性。最近几年的研究发现分子伴侣在体内蛋白质折叠过程中具有十分重要的作用。

## 一、分子伴侣的基本概念

1978 年，Laskey 等首先使用术语“分子伴侣”来描述核质素(nucleoplasmin)在核小体组装过程中的作用<sup>[4]</sup>。他们发现 DNA 和组蛋白在生理条件下迅速混合将导致沉淀。当反应体系中存在核内富含的核质素时，DNA 和组蛋白则形成核小体核心颗粒(组蛋白 8 聚体和 146 b.p. 的 DNA)。在反应中，核质素与组蛋白结合，一方面屏蔽组蛋白正电荷引起的静电排斥，从而促进组蛋白单体之间的相互作用；另一方面减弱 DNA 和组蛋白之间的静电吸引，将沉淀降至最低程度。核质素促进 DNA 和组蛋白的正确组装，但其本身不是组装产物

核小体的一部分。

早期研究表明，包括核质素在内的一些蛋白质可以协助其它蛋白质折叠和组装，而且这类蛋白质广泛分布于原核和真核细胞内。1987 年，Ellis 将凡是能够促进蛋白质折叠和组装的一类蛋白质统称为分子伴侣<sup>[5]</sup>。随后 Ellis 等又提出了分子伴侣的基本概念：在蛋白质折叠和组装过程中，分子伴侣防止多肽链内或链间因疏水面等相互作用表面瞬间暴露而形成错误结构，并且还可以破坏已经形成的错误结构。分子伴侣本身不是折叠或组装产物的一部分<sup>[6]</sup>。

最近几年的体外和体内研究证实，分子伴侣在新生肽链体内折叠以及变性或重组蛋白体外重折叠过程中防止无活性聚集物形成。在细胞内，分子伴侣的底物包括新生肽链、变性蛋白和已经具有天然构象的蛋白质大分子。因此除了蛋白质合成和成熟以外，分子伴侣还参与一系列其他细胞过程：蛋白质跨膜移位和运输、蛋白质分子之间相互作用(如 DNA 复制、包涵素笼的组装去组装)、各种应激反应以及蛋白质降解等。

## 二、分子伴侣分类

目前已经确认的大多数分子伴侣可以分为三个高度保守的蛋白质家族，即伴侣蛋白(chaperonin)或热休克蛋白 Hsp 60、Hsp 70 以及 Hsp 90<sup>[2]</sup>。此外分子伴侣还包括核质素、T 细胞受体结合蛋白等。上述三个热休克蛋白家族的大部分成员均是组成表达的蛋白，对细胞

感谢 Ellis 教授、Saibil 博士和马贤凯教授提供有关论文以及薛绍白教授的热情鼓励。

正常生长和增殖是必需的。在包括热激反应在内的各种应激反应中,它们的表达可进一步增强。由于热休克蛋白不仅在热激反应中表达,而且在其它应激反应中亦表达,所以热休克蛋白又称应激蛋白(stress protein)。在各种应激反应中,引起热休克蛋白表达的共同原因可能是变性蛋白在细胞中的积累。因此大多数分子伴侣为热休克蛋白。表1中列举了一些分子伴侣在不同类型细胞中的分布。

表1 分子伴侣在细胞内的分布

分子伴侣	生物体	细胞器/隔室
<b>Stress-70 家族</b>		
Dnak	大肠杆菌	细胞溶质
Hsp 72/73	哺乳动物	细胞溶质
Ssc 1 p	酵母	线粒体
Hsp 70	哺乳动物	线粒体
BiP	哺乳动物	内质网
伴侣蛋白 GroE	亚族	
GroEL/ES	大肠杆菌	细胞溶质
Hsp 60	哺乳动物	线粒体
Mif 4p	酵母	线粒体
RuBP	植物	叶绿体
伴侣蛋白 TCP 1	复合物亚族	
TF 55	古细菌	细胞溶质
TCP 1 复合物 (CCT 或 TriC)	哺乳动物	细胞溶质

在蛋白质折叠过程中,Stress-70 家族成员以单体形式与新生肽链结合,稳定其未折叠状态并防止发生错误折叠或聚集<sup>[2]</sup>。在有利于多肽链折叠的环境下,Stress-70 分子伴侣在ATP 水解作用下释放多肽链,使其发生折叠。底物蛋白在 Stress-70 协助下可以完成折叠,或者在释放后与跨膜移位装置以及伴侣蛋白相互作用最终获得天然构象。Hsp 90 在甾类激素受体折叠、运输和功能调节方面起重要作用<sup>[7]</sup>。

伴侣蛋白根据氨基酸顺序同源性可以分为 GroE 亚族和 TCP 1 复合物亚族<sup>[8]</sup>。GroEL 和 GroES 最初被发现参与某些噬菌体组装。Hsp 60 促进线粒体中多种酶的折叠和组装。高等植物叶绿体二磷酸核酮糖羧化酶固氧酶

(Rubisco)的组装需要 Rubisco 亚基结合蛋白(RuBP)协助。Ellis 等发现 RuBP 的  $\alpha$  亚基在整个氨基酸顺序上与 GroEL 具有很高的同源性(46%),从而在 88 年提出“伴侣蛋白”这一术语<sup>[9]</sup>。因伴侣蛋白亚基分子量约为 60 kDa,故 GroE 亚族的伴侣蛋白又称 chaperonin 60 或简称为 cpn 60;相应地, GroEL 的辅因子 GroES 称 cpn 10。GroE 亚族伴侣蛋白在细胞内的分布支持了真核细胞起源的内共生假设。TCP 1(t-complex polypeptide-1)复合物在 92 年被确定为伴侣蛋白<sup>[10-12]</sup>。该复合物是一个异寡聚体, TCP 1 是它的一个亚基,该亚基的表达与热激反应无关<sup>[10]</sup>。TCP 1 复合物协助肌动蛋白和微管蛋白折叠<sup>[11,12]</sup>。TCP 1 亚基与 GroEL 的同源性较弱,但与古细菌中的 TF 55 有很高的同源性(40%)<sup>[13]</sup>。在促进肌动蛋白折叠时, TCP 1 复合物不需要 GroES 类似物协助<sup>[14]</sup>。但在  $\alpha$  和  $\beta$  微管蛋白的情形, TCP 1 复合物则需要两个蛋白因子协助,其中辅因子 A 的作用与 GroES 类似。这表明 TCP 1 复合物的作用机制与 GroEL 相似。但顺序分析显示上述辅因子 A 与任何已知蛋白无明显同源性。TCP 1 复合物被确定为伴侣蛋白填补了真核细胞细胞溶质内无伴侣蛋白的空白。

### 三、Stress-70 和伴侣蛋白的协作性

Stress-70 分子伴侣和伴侣蛋白共同存在于原核和真核细胞细胞溶质及线粒体内,但两者在蛋白质折叠过程中所起的作用是不同的。线粒体 Hsp 70 可与进入基质侧的伸展肽段结合,并通过与内膜上的移位装置相互作用,牵引多肽链通过内外膜而进入基质<sup>[15]</sup>。多肽链进入基质后最终在 Hsp 60 协助下完成折叠和组装。核磁共振研究显示多肽与 Stress-70 家族的 Dnak 结合时呈伸展状态<sup>[16]</sup>,而伴侣蛋白 GroEL 则结合处于较高折叠状态的底物蛋白<sup>[17]</sup>。上述证据间接表明,在细胞溶质和线

粒体中 Stress-70 和伴侣蛋白顺序参与多肽链的折叠过程。

最近有两项研究为 Stress-70 和伴侣蛋白之间的协同性提供了直接证据<sup>[18,19]</sup>。在变性硫氰酸酶(rhodanese)体外重折叠过程中,DnaK 与部分折叠的多肽链结合,在热休克蛋白 DnaJ 参与下,稳定该多肽链的构象并防止无活性结构形成<sup>[18]</sup>。在 ATP 和另一个热休克蛋白 GrpE 存在时,DnaK 将多肽链转移至伴侣蛋白 GroEL。GroEL 在 GroES 协助下使变性蛋白复性。在兔网织红细胞溶物(retic lysate)体系中所进行的虫荧光素酶(luciferase)合成过程中有关多肽链延伸和折叠关系的研究中,Hsp 70 (DnaK 类似物)和 Hsp 40 (DnaJ 类似物)在肽链延伸过程中即与之结合,防止在产生足够长的肽链以折叠成一个结构域之前肽段发生错误折叠<sup>[19]</sup>。该结构域的形成不仅需要 Hsp 70 和 Hsp 40 协助,而且还依赖于 ATP 水解作用以及伴侣蛋白 TCP 1 复合物。

综上所述,新生肽链的折叠过程可分为两个阶段:在折叠初期,Stress-70/DnaJ/GrpE 类型的分子伴侣与正在延伸的肽链结合,防止发生错误折叠;在折叠后期,伴侣蛋白结合分开的结构域或完整多肽链折叠中间产物,协助其折叠至天然构象<sup>[20]</sup>。由于目前确认为 TCP 1 复合物的生理底物蛋白仅有肌动蛋白和微管蛋白,所以在真核细胞细胞溶质内其它蛋白的折叠通路还不清楚。

#### 四、伴侣蛋白 GroEL 和 GroES 作用机理

大肠杆菌中的 GroEL 和 GroES 是最早确定、研究最为深入的伴侣蛋白。GroEL 的一个突出特点是对底物蛋白几乎无选择性,因而被广泛用于变性蛋白体外重折叠研究,并且在生物工程上具有重要应用价值。体外和体内研究均证实,GroEL 和 GroES 在蛋白质折叠过程中可以防止聚集体形成<sup>[21,22]</sup>,提高底物蛋白

的正确折叠率,但不影响重折叠反应速度<sup>[1,23]</sup>。底物蛋白与 GroEL 结合时处于折叠中间态,即具有二级结构及松散排列的三级结构,其特点是易于聚集或形成无活性结构<sup>[1,18,24]</sup>。

X 射线衍射结构测定证实,GroEL 是由 14 个相同亚基组成的寡聚体,亚基分子量约为 60 kDa<sup>[25]</sup>。这 14 个亚基在空间中排布成两个环组成的柱状体,每个环含 7 个亚基。在每个环的中心,7 个亚基围成 1 个空腔,其直径约为 4.5 nm。与上述结构测定同时进行的突变体研究确定了 GroEL 各功能位点的分布<sup>[26]</sup>,见图 1(a)。GroEL 通过疏水相互作用结合底物蛋白,结合表面位于每一环空腔处。GroES 为由 7 个亚基组成的单环结构,亚基分

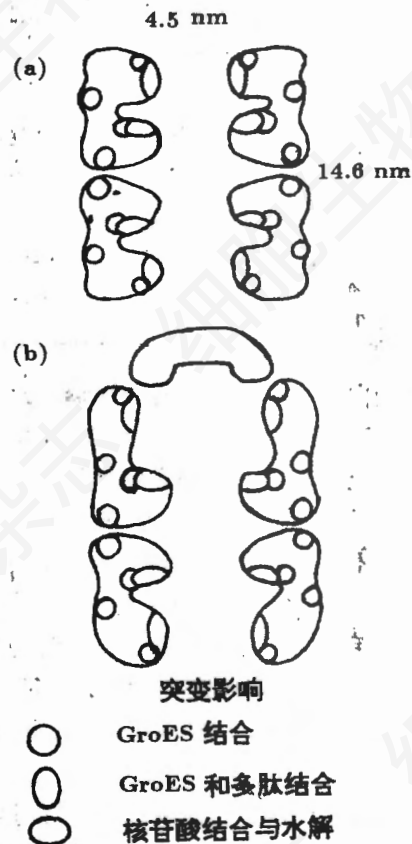


图 1 GroEL 及 GroEL-GroES 复合物结构和功能位点分布<sup>[32]</sup>

(a) GroEL 纵截面 (b) GroEL-GroES 非对称复合物纵截面

子量为 10 kDa<sup>[9]</sup>。GroEL 具有弱 ATP 酶活性<sup>[27]</sup>。GroES 对 GroEL 生化性质具有重要调节作用。在 ATP 或 ADP 存在下, GroEL 和 GroES 结合成非常稳定的 1:1 复合物<sup>[28,29,20]</sup>, 称非对称复合物, 见图 1(b)。GroES 结合抑制 GroEL 的 ATP 酶活性, 其抑制程度与 K<sup>+</sup> 离子浓度有关<sup>[30]</sup>。GroES 可以提高 GroEL 结合和催化 ATP 水解的协同性<sup>[23]</sup>。每个 GroEL 分子可以结合 1 至 2 个底物蛋白分子<sup>[28]</sup>。底物蛋白结合对 GroEL 的 ATP 酶活性具有提高作用<sup>[23]</sup>。底物蛋白天然构象的获得与 ATP 结合和水解相关<sup>[23]</sup>。电镜研究表明 ATP 结合引起 GroEL 发生 2 nm 以上的构象变化<sup>[29]</sup>。

Hartl 等和 Lorimer 等分别提出有关 GroEL 和 GroES 作用机理的模型<sup>[1,31,32]</sup>(以下分别称 H 模型和 L 模型)。在这两个模型中, GroEL 周期地结合、释放底物蛋白; 在每次释放间隔内, 底物蛋白发生折叠; 两者的相互作用一直持续到底物蛋白最终获得天然构象为止, 此时底物蛋白分子上与 GroEL 结合的结构组件(motif)被埋藏在其内部。ATP 周期性结合和水解驱动上述过程的进行。底物蛋白释放依赖于 ATP 水解。GroES 提高 GroEL 结合和催化 ATP 水解的协同性。GroEL 和 GroES 作用机理的阐明有待于进一步研究。以下四个问题值得注意: 1. 底物蛋白对 GroEL 和核苷酸相互作用的影响。在 H 模型中, 底物蛋白与 GroEL 双环中的一环结合将引起与另一环结合的 ADP 和 GroES 解离, 从而启动 ATP 周期性结合和水解<sup>[31]</sup>。在 L 模型中, ADP 和 GroES 的解离是由与另一环结合的 ATP 水解造成的<sup>[1]</sup>。在重复 Hartl 等的实验时, Lorimer 等发现 ADP 和 GroES 的解离是由变性蛋白所携带的低浓度盐酸胍引起的。因此 Lorimer 等认为底物蛋白在 ATP 周期性结合和水解过程中仅起被动作用。究竟底物蛋白起主动作用还是被动作用尚有待进一步证实。2. GroEL 与底物蛋白结合可使之折叠或去折叠(unfolding)。H 模型认为底物蛋白与 GroEL 空腔处疏

水结合面相互作用时, 多肽链沿该表面的滑动可对折叠产生促进作用<sup>[32]</sup>。在 L 模型中, 每次释放间隔内底物蛋白折叠可产生两种结果: 获得天然构象或形成错误折叠。错误折叠的底物蛋白重新结合 GroEL; GroEL 具有去折叠的能力, 可以断开某些非共价键; 随后的释放使底物蛋白得到一次新的折叠机会。GroEL 通过这种机制保证底物蛋白最终获得天然构象。核磁共振研究表明 GroEL 结合导致球状蛋白质结构稳定性下降<sup>[17]</sup>。支持 L 模型的另一证据是 GroEL 结合增强了底物蛋白对蛋白酶的敏感性<sup>[33]</sup>。在这项研究中, 底物蛋白在周期性结合、释放和折叠过程中对蛋白酶敏感性逐步下降, 说明其折叠程度是逐渐增加的, 这反映出 GroEL 可能影响底物蛋白的折叠路径。在同一实验中, GroEL 和 GroES 与变性肌动蛋白的相互作用虽然可使后者的蛋白酶敏感性下降, 但却不能使其最终获得天然构象。这表明 GroEL 具有一定的底物蛋白专一性, 并且此种专一性与 GroEL 折叠和去折叠的能力有关。上述实验还表明, TCP 1 复合物与 GroEL 类似, 可以周期性地结合并释放底物蛋白(肌动蛋白和微管蛋白), 使其蛋白酶敏感性逐步下降。

3. GroES 与 GroEL 结合导致同环结合的底物蛋白释放。由于 GroES 和底物蛋白与 GroEL 结合的位点重叠, 见图 1(a), H 模型认为 GroES 结合可引起同环结合的底物蛋白释放至空腔内, 从而提出了底物蛋白释放的另一机制(物理机制)<sup>[32]</sup>。电镜三维重构研究表明 GroES 结合可引起 GroEL 构象发生剧烈变化<sup>[29]</sup>, 见图 1(b)。这种物理释放作用在 GroEL 协助底物蛋白折叠过程中的意义尚需进一步研究。

4. GroEL 空腔的作用。X 射线衍射结构测定和突变体研究证实底物蛋白结合在 GroEL 空腔处。每环空腔体积至少可容纳分子量为 35 kDa 的底物蛋白折叠中间产物<sup>[32]</sup>, 分子量与此接近的底物蛋白有硫氰酸酶(rhodanese, 33 kDa)及柠檬酸合成酶(citrate synthase, 50 kDa)等等。在底物蛋白周期性结合、释放

和折叠过程中,由于 GroES 与 GroEL 结合可导致同环结合的底物蛋白释放进入空腔内,所以 GroEL 的底物蛋白是否有一个质量上限还不清楚。目前已知 GroEL 可协助 120 kDa 的光敏色素(phytochrome)折叠<sup>[34]</sup>。在 GroEL 协助下,较大的底物蛋白的折叠可能是逐个结构域顺序进行的。在一定条件下, GroEL 和 GroES 可形成对称复合物(GroES:GroEL:GroES)<sup>[35,36]</sup>。有研究指出该对称复合物也具有协助底物蛋白折叠的功能,并假设底物蛋白最初结合在 GroEL 分子外表面,从而回避质量上限的限制<sup>[35]</sup>。这一假设目前看来是不能成立的。

## 五、结束语

蛋白质折叠是生命科学的基本问题之一。分子伴侣概念的提出和研究工作加深了对蛋白质折叠规律和机制的认识。蛋白质自装配原则仍然是正确的,但是蛋白质在细胞内的折叠需要分子伴侣的协助,因此蛋白质折叠过程不是完全自发的,而且是一个需能过程。分子伴侣不仅可以防止蛋白质在折叠过程中形成聚集物或无活性结构,提高正确折叠率,而且还可能影响折叠路径。研究分子伴侣的作用机理具有重要的理论意义和应用价值。在这方面的研究中,阐明分子伴侣识别和结合蛋白质折叠中间产物的分子机制尤为重要。目前对以 GroEL 和 GroES 为代表的伴侣蛋白作用机理的研究引起了许多实验室的兴趣与重视,不断有重要研究成果发表,可以预见在不远的将来有可能取得重大进展。

## 摘 要

分子伴侣主要由三个高度保守的蛋白质家族组成,这三个家族的成员广泛分布于原核和真核细胞中。TCP 1 复合物是真核细胞细胞溶质内的伴侣蛋白。分子伴侣在蛋白质折叠过程中防止多肽链形成聚集物或无活性结构,提高正确折叠率。本文重点讨论 Stress-70 家族蛋白质和伴侣蛋白协助蛋白质折叠过程中的协同性

以及伴侣蛋白 GroEL 和 GroES 的作用机理。

## 参 考 文 献

- [1] Todd MJ, Viitanen PV, Lorimer GH, 1994, *Science*, 265: 659—666.
- [2] Gething M-J, Sambrook J, 1992, *Nature*, 355: 33—45.
- [3] Seckler R, Jaenicke R, 1992, *FASEB J*, 6: 2545—2552.
- [4] Laskey RA, Honda BM, et al., 1978, *Nature*, 275: 416—420.
- [5] Ellis RJ, 1987, *Nature*, 328: 378—379.
- [6] Ellis RJ, van der Vies SM, Hemmingsen SM, 1989, *Biochem. Soc. Symp.*, 55: 145—153.
- [7] Pratt WB, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 21455—21458.
- [8] Ellis RJ, 1992, *Nature*, 358: 191—192.
- [9] Hemmingsen SM, et al., 1988, *Nature*, 333: 330—334.
- [10] Lewis VA, et al., 1992, *Nature*, 358: 249—252.
- [11] Yaffe MB, et al., 1992, *Nature*, 358: 245—248.
- [12] Gao Y, et al., 1992, *Cell*, 69: 1043—1050.
- [13] Kim S, et al., 1994, *Trends Biochem. Sci.*, 19: 543—548.
- [14] Gao Y, et al., 1994, *J. Cell Biol.*, 125: 989—996.
- [15] Schneider H-C, et al., 1994, *Nature*, 371: 768—774.
- [16] Landry SJ, et al., 1992, *Nature*, 355: 455—457.
- [17] Zahn R, et al., 1994, *Nature*, 368: 261—265.
- [18] Langer T, et al., 1992, *Nature*, 356: 683—689.
- [19] Frydman J, et al., 1994, *Nature*, 370: 111—117.
- [20] Hartl F-U, et al., 1994, *Trends Biochem. Sci.*, 19: 20—25.
- [21] Ellis RJ, 1994, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4: 117—122.
- [22] Horwich AL, et al., 1993, *Cell*, 74: 909—917.
- [23] Jackson GS, et al., 1993, *Biochemistry*, 32: 2554—2563.
- [24] Van der Vies SM, et al., 1992, *Biochemistry*, 31: 3635—3644.
- [25] Braig K, et al., 1994, *Nature*, 371: 578—586.

- [26] Fenton WA, et al., 1994, *Nature*, 371: 614—619.
- [27] Saibil HR, et al., 1993, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3: 207—213.
- [28] Langer T, et al., 1992, *EMBO J*, 11: 4757—4765.
- [29] Chen S, et al., 1994, *Nature*, 371: 261—264.
- [30] Todd MJ, et al., 1993, *Biochemistry*, 32: 8560—8567.
- [31] Martin J, et al., 1993, *Nature*, 366: 228—233.
- [32] Hartl F-U, 1994, *Nature*, 371: 557—559.
- [33] Tian G, et al., 1995, *Nature*, 375: 250—253.
- [34] Grimm R, et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 5220—5226.
- [35] Azem A, et al., 1994, *Science*, 265: 653—655.
- [36] Schmidt M, et al., 1994, *Science*, 265: 656—659.

### 发育生物学和免疫学讲习班

由中国科学院、法国国家科研中心和德国马普学会共同主办的发育生物学讲习班和免疫学讲习班将分别于1996年10月21日至25日和10月28日至11月1日在中国科学院上海细胞生物研究所举行。组委会将资助参加者注册费、旅费和食宿费。申请者必须是35岁以下、具有硕士或博士学位，英语口语能力强。申请者需提供一份英文个人简历(包括已发表论文)和一份英文工作情况介绍，于1996年7月31日前寄至上海市岳阳路320号中国科学院上海细胞生物研究所戴贇英收(邮编 200031)。组委会将对录取者进行面试。

### 《细胞生物学杂志》编辑委员会

主 编：左嘉客  
 副主编：姚曾序 包永德 朱治平  
 编 委：丁明孝 史 璨 李文安 陈瑞阳 陈尊器  
           张宗梁 张伟成 杨弘远 柳惠图 陆长德  
           施渭康 唐佩弦 赵德标 李逸平  
 秘 书：卢建平

### 名词讨论

#### Meiogynogenesis 译名探讨

近期在一杂志上看到“较小雌核发育”一词，不明白它的含意，查看了原文才知是 meiogynogenesis 的中译名。查阅了几本专业书籍和词典，均无该词的译法。从词的构成上看，该词显然是由 meio-和 gynogenesis 两部分组成。后者统译为雌核发育，前缀 meio-在《英汉生物学词汇》里解释为较小、较少，但不能就此简单地把 meiogynogenesis 译为较小雌核发育。雌核发育是细胞工程育种的一个重要组成部分。在人工诱导鱼类雌核二倍体过程中，使卵细胞核的单倍染色体加倍成为二倍体可以有两途径，一是阻止第二次减数分裂的继续进行，抑制第二极体外排，二是抑制第一次卵裂。很明显，meiogynogenesis 是指通过第一条途径使染色体加倍的雌核发育；再者，词缀 meio-来源于希腊文 meioum，其意是 to diminish，在细胞生物学中视具体情况常译为“减数”或“减数分裂”，如 meiosis(减数分裂)、meiosome(减数染色体)、meiospore(减数孢子)、meiophase(减数分裂期)等。因此，根据 meiogynogenesis 一词所指的具体含义，拟译成减数分裂(阻止型)雌核发育较为合理，虽然译名长了些，但能确切地反映该词的本意。这一译名是否妥当，祈请专家、同仁指教。

薛良义(浙江水产学院养殖系 宁波 315010)